

Zpráva z kongresu IFCC-WordLab Firence 6.-11. 6. 1999

XVII. mezinárodní kongres klinické chemie a laboratorní medicíny se konal ve Firenci (Itálie) ve dnech 6.-11. června 1999. Šlo o světový kongres, který se pořádá jednou za tři roky. Předchozí kongres se konal v roce 1996 v Londýně a příští bude v roce 2002 v Kyotu (Japonsko). V období mezi světovými kongresy se konají kongresy evropské. Ten příští v roce 2001 bude v Praze.

IFCC-WordLab 99 byl opravdu mohutnou akcí. Kongresu se zúčastnilo 4908 odborníků z 94 zemí světa a současně probíhající výstavy přístrojů a diagnostik se zúčastnilo dalších 2500 osob, takže

dohromady to bylo 7408 osob. Kongres se konal v kongresovém centru, které je umístěno v pevnosti Fortezza da Basso. Kongresové centrum je z větší části umístěno v podzemí pevnosti, kde jsou také přednáškové sály, a je kompletně klimatizováno. O krásách a bohatství památek města Firence se jistě není třeba zmiňovat, protože to jsou skutečnosti všeobecně známé.

Odborný program byl velmi bohatý. Kromě 385 přednášek, které se konaly v 7 přednáškových sálech, často v několika sálech současně, se každý den měnily poster. Posterů bylo denně kolem 400,

takže za 4 dny to bylo 1697 sdělení, která byla prezentována touto formou. Přednášky začínaly v 8.30 h a končily v 18.30 h. Výstavy firem se zúčastnilo 102 vystavovatelů.

Tematický rozsah přednášek odrážel obrovskou šíři oboru laboratorní medicíny. Každý den zahajovala program plenární přednáška (Apoptosis, From genome sequence to protein functions, Genetics and Environment, The T helper 1 and T helper 2 paradigm in human diseases, Proteome research and its impact on laboratory medicine). Klasická klinická biochemie ustoupila poněkud do pozadí, dominovala biochemie jako jednotící prvek všech témat kongresu od molekulární biologie, imunologie až k mikrobiologii a virologii. Zejména prolínání genetiky do klinické chemie bylo velmi zřejmé. Od genové terapie (přání a skutečnost), přes biochemii a genetiku tumorových markerů, genetiku aterosklerózy, nové metody genetické analýzy, genetický základ odpovědi organismu na léky až po genetické analýzy u roztroušené sklerózy, genetiku atopie, genetické studie u diabetu, genetické analýzy regulace hmotnosti atd. Celé bloky přednášek byly věnovány monitorování léků, klinické toxikologii, robotizaci a automatizaci laboratorní, stárnutí ve vztahu k neurologickým onemocněním, buňkám endotelu.

Další přednášky byly věnovány organizační struktuře laboratorní v Evropě, kontrole kvality práce laboratorní a jejich akreditaci. Velmi zajímavé bylo také sympozium o vztahu mikrobiálních agens a koronárních onemocnění. Šlo především o chronické infekce s *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, dentální onemocnění a cytomegalovirus.

Hematologická problematika, hlavně v oblasti měřicí techniky, správné laboratorní praxe a otázkách souvisejících s trombózou a hemostázou, byla řešena v několika blocích. Z plenárních lekcí se obecnou problematikou z oblasti hematologie zabývala přednáška prof. Nagaty z oddělení pro genetiku Lékařské fakulty v Osace pojednávající o apoptóze. Ve svém sdělení prof. Nagata popsal hlavně úkoly receptorů, faktorů a ligand, které mají vliv na spontánní buněčný proces vedoucí k samovolnému sebezničení buněk.

V bloku „Nové aspekty hemostázy a trombózy“, koordinovaném prof. Muszbekem z Maďarska, byly probrány otázky genetického polymorfismu destičkových adhezních receptorů na jejich vzájemné vztahy u trombotických nemocí (J. Corral, Španělsko), dále laboratorní diagnostické metody u fibrinolýzy (C. Kluft, Nizozemí), klinické a diagnostické aspekty koagulačního faktoru XIII a jeho účasti při zpevnění fibrinového vlákna (L. Muszbek). Jako velmi zajímavá se jeví genová mutace (P151L) inhibitoru tkáňového faktoru (TFPI), která je spojována s vyšším rizikem venózní trombózy (K. Kleesiek, Německo). Byla zde řešena i dnes velmi diskutovaná otázka úlohy zvýšené hladiny homo-

cysteinu při vzniku trombózy (A. D. Angeloni, Itálie).

V části o automatizaci a robotizaci laboratorních procesů bylo prezentováno několik příspěvků amerických autorů. V současné době je prakticky 80 % všech procesů v klinické laboratorní automatizovatelných. Toto číslo se neustále zvyšuje. Rozsáhlá automatizace však odhalila i některé negativní aspekty tohoto procesu (ztráta kontaktu s pacientem, klinikou a ošetřujícím lékařem, odosobněný proces, syndromy pásové výroby - neustálé opakování stejných úkonů atd.). Po těchto zkušenostech se v zemích, které mají tento proces nejvíce rozvinutý, ukazuje jako vhodné řešení ponechat na klinikách laboratorní centra zaměřená k řešení určitých diagnostických oblastí. Taková centra jsou pak kontrolními systémy propojena s centrální laboratorní.

Přednášky zaměřené na GLP (good laboratory practice) a kontrolní systémy kvality měly, jak je to již zvykem po několika posledních letech, velmi vysokou odbornou úroveň. K tomu přispělo také několik přednášek českých autorů (Palička, Jabor). Ukazuje se, že ke zdárnému zavedení těchto procesů v České republice je nezbytné urychlit legislativní procesy a získat výraznější podporu odpovědných orgánů.

Z vystavujících firem zaujal nový typ hematologického analyzátoru Sysmex 8000 SX s velmi širokým spektrem sledovaných parametrů krevního obrazu, hlavně rozlišení mladších a starších buněčných forem. Firma Abbott (USA) rozšířila spektrum nových analyzátorů o analyzátor Cell Dyne 4000 s plně automatizovaným transportním systémem a měřicími místy pro automatické stanovení retikulocytů. Z menších analyzátorů vhodných i pro vybavení polních laboratorí byl firmou Becton Dickinson vystavován vylepšený analyzátor QBC autoread-Plus s automatickým odpočtem měřených parametrů. Barvicí analyzátory byly zastoupeny firmou Vescor. Nový plně automatický koagulační automat Amax 400 Plus předváděla firma Sigma a firma Behring představila koagulometr Coa Lab 6000. Z dalších zajímavostí lze uvést plně digitální snímací systémy DP 10 pro mikroskopická hodnocení, včetně barevného vytisknutí vybraných snímků, a software DP-SOFT, dále přístroj PFA-100 k zachycení procesu primární hemostázy a nakonec plně automatickou jednotku k odečítání sedimentací pro 20 nebo 60 vzorků. Vzhledem k velkému počtu vystavujících firem (kolem 100) jde jen o hrubý průřez laboratorní problematikou.

Velkou předností mezinárodních kongresů klinické chemie je, že ve svém programu vždy zahrnují přednášky, případně celá sympozia, zaměřená na nové vědecké poznatky a metody, u nichž se předpokládá, vzhledem k jejich závažnosti, brzké uplatnění v klinické praxi. Konference ve Florencii nebyla v tomto směru výjimkou. Takovou byla i plenární přednáška prof. Hochstrassera z Univerzitní ne-

mocnice v Ženevě charakterizující současný výzkum v oblasti „**proteomu**“ a dále pak samostatná sekce, která vlastně souvisí také s proteomovou problematikou a která byla věnována metodě hmotnostní spektrometrie.

Co je to „**proteom**“. Tento termín poprvé zazněl v r. 1994 na konferenci věnované technice označované jako vysokorozlišovací dvojrozměrná gelová elektroforéza, která představuje v současnosti nejcitlivější metodu pro separaci komplexních proteinových směsí. Slovo proteom je vlastně analogií slova genom a označuje studie zaměřené na proteiny, a to ve smyslu jejich identifikace, charakterizace a kvantifikace. Potřeba proteomových studií vyplývá ze současných zkušeností týkajících se mapování bakteriální i savčí DNA. Dosavadní výsledky ukazují, že v buňce neexistuje přesná korelace mezi hladinami „messenger“ ribonukleových kyselin na jedné straně a jejich příslušných produktů - proteinů vznikajících translací na ribosomech na straně druhé. Dále více než 90 % buněčných proteinů je syntetizováno ve formě prekurzoru, který je postupně v buňce upravován celou řadou enzymových reakcí (tzv. posttranslační modifikace, např. fosforylace, glykosylace, vazba mastných kyselin nebo proteolytické štěpení) a teprve potom nabývá plné funkční aktivity. Je zřejmé, že jeden protein může podléhat různým typům posttranslačních modifikací, z čehož vyplývá, že ve skutečnosti jeden gen může dávat vzniknout několika proteinovým produktům, které se označují jako izoformy a mohou mít rozdílné biologické účinky. V neposlední řadě je pro biologickou aktivitu proteinu nezbytná i jeho přesná buněčná lokalizace. Studium těchto biologických dějů nemůže probíhat na genové úrovni, nýbrž je nutná kvalitativní a zejména kvantitativní analýza tisíce proteinů, tj. proteomová studie.

Klinický význam proteomových studií se předpokládá v postupném nalezení skupin proteinů, jejichž syntéza nebo naopak alterace v jejich produkci budou naprosto charakteristické pro vznik daného onemocnění. Tyto proteiny budou pak využity pro časnou diagnostiku onemocnění, monitorování stavu nemocného a také pro vývoj nových léků.

V přednášce prof. Hochstrassera byla popsána proteomová laboratoř umístěná v Ženevě v Univerzitní nemocnici, která je právě zaměřena na identifikaci nových proteinů, které by bylo možné využít v klinické praxi. Tato laboratoř je pracovně označována jako **klinický molekulární skener**. Podobně jako jiné proteomové laboratoře je metodika ženevského centra založena na separaci proteinů pomocí vysokorozlišovací dvojrozměrné gelové elektroforézy. Separované proteiny jsou potom elektroforeticky přeneseny z gelu na PVDF (polyvinyliden difluorid) membránu a identifikovány hmotnostní spektrometrií. Velkým přínosem této laboratoře je urychlení procesu přípravy jednotlivých proteinů

pro identifikaci, která je založena na porovnání hmotnostních spekter peptidů vznikajících *in vitro* enzymovým proteolytickým štěpením jednotlivých proteinů a teoretických hmotnostních spekter peptidů lokalizovaných v databázích. Tradiční postup spočívá na postupné analýze jednotlivých proteinů a je velmi zdoluhavý, když si představíte, že na jednom gelu může být rozlišeno až 5000 proteinů. Švýcarská skupina využívá pro štěpení separovaných proteinů enzym trypsin, který je vázán na povrchu hydrofilní membrány. Tato membrána se vkládá před vlastním elektroforetickým přenosem proteinů mezi vlastní gel s rozdělenými proteiny a PVDF membránu. To znamená, že jednotlivé proteiny jsou štěpeny trypsinem již během elektrotransferu a před jejich vlastním uchycením na PVDF membránu, kde jsou pak přítomny pouze jejich fragmenty - peptidy. Celá membrána je potom umístěna na terčík spektrometru a postupně snímána laserem. Hmotnostní spektra jednotlivých fragmentů jsou bezprostředně vyhodnocována porovnáním s údaji v databázích. Tímto způsobem by mělo být brzy možné identifikovat stovky proteinů denně.

Na sympoziu věnovaném hmotnostní spektrometrii zazněly tři klíčové přednášky. První z nich přednesl prof. Roepstorff z Odense (Dánsko), který se soustředil na využití této techniky v proteomové laboratoři a prezentoval vlastní výsledky v oblasti identifikace posttranslačních modifikací proteinů. Revoluční využití hmotnostní spektrometrie představuje její aplikace zaměřená na stanovení hladin jednotlivých proteinů přímo v tkáňových řezech. Výsledky získané touto zcela novou zobrazovací technologií byly prezentovány prof. Capriolim z Nashvillu (USA) a dokumentovaly metabolismus některých neuropeptidů v hypofýze a pankreatu a také molekulární změny na úrovni proteinů u nádorů plic, prostaty a střeva. Třetí přednášku přednesl dr. Hunt z Charlottesville (USA), který metodu hmotnostní spektrometrie využil k identifikaci imunodominantních peptidů prezentovaných antigeny MHC I. třídy. V současné době byly již identifikovány epitopy, které aktivují cytotoxické T-lymfocyty k eliminaci buněk melanomu, dále nádoru plic, leukemických buněk před transplantací dřeně a také k likvidaci buněk infikovaných virem HIV nebo některými bakteriemi. Pět z těchto identifikovaných antigenů bylo posttranslačně modifikováno. Všechny tyto výsledky jsou velmi perspektivní z hlediska konstrukce nových typů vakcín nebo jiných imuno-regulačních preparátů.

Sborník z kongresu o 570 stranách je k dispozici případným zájemcům u autorů této zprávy.

Doc. RNDr. Miloš Tichý, CSc.,
RNDr. Miroslav Pecka, CSc.,
MUDr. Jiří Stulík, CSc.
VLA JEP, Hradec Králové